
ÍNDICE

RESUMEN	viii
1. INTRODUCCIÓN	10
2. MARCO TEÓRICO.....	13
2.1 Lacasas	13
2.2 Propiedades moleculares de las Lacasas	14
2.3 Mecanismo de acción.....	17
2.4 Producción de lacasas	19
2.5 Genes de lacasas.....	20
2.6 Regulación de la expresión génica.....	21
2.6.1 PCR en tiempo real.....	22
2.7 Regulación de la expresión de lacasas	27
2.8 Secuencias promotoras.....	33
2.9 Aspectos biotecnológicos de las lacasas	35
2.9.1 Industria textil.....	35
2.9.2 Industria papelera	36
2.9.3 Industria alimentaria.....	37
2.9.4 Industria farmacéutica.....	38
2.9.5 Nanobiotecnología	38
2.9.6 Biorremediación de suelos.....	39
2.9.7 Química sintética	40
2.9.8 Cosmética.....	40
2.10 <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2	40
3. HIPÓTESIS	42
4. JUSTIFICACIÓN	43
5. OBJETIVOS	44
5.1 OBJETIVO GENERAL	44
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	45
7. METODOLOGÍA.....	46
7.1 Microorganismo	46
7.2 Producción del inóculo	46
7.3 Preparación de residuos lignocelulósicos.....	46
7.4 Producción de lacasas	47
7.5 Actividad de la lacasa.....	48
7.6 Cuantificación de azúcares reductores.....	48
7.7 Aislamiento de ARN total y síntesis de cDNA	48
7.8 Amplificación del gen lacasa mediante qPCR	49
7.9 Estrategia de cuantificación y normalización de los datos de qPCR	50
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
8.1 Efecto de los residuos lignocelulósicos en la producción de lacasa de <i>Trametes hirsuta</i> (Bm-2).....	51
8.2 Dinámica transcripcional de lacasas en sustratos lignocelulósicos y medio mínimo	58
8.3 Análisis de la expresión génica con el método $\Delta\Delta^{Cq}$	62
8.4 Análisis de los niveles de expresión y actividad enzimática	66
9. CONCLUSIONES.....	69
10. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	70
11. REFERENCIAS.....	71

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 2.1 Sitio activo de la lacasa de Bacillus subtilis.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 2. 2 Representación cinta de la estructura cristalográfica de rayos X de la lacasa de Trametes versicolor.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 2.3 Mecanismo de acción de la lacasa.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 2.4 Marcadores fluorescentes para PCR en tiempo real. A) SYBR Green; B) Sondas de hidrólisis</i>	<i>24</i>
<i>Figura 2.5 Curva de amplificación de ADNc.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 2.6 Curva de fusión de ADNc.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 8.1 Cinética de producción de lacasa en cultivos sumergidos de Trametes hirsuta Bm-2 inducidos con diferentes residuos lignocelulósicos a 35 °C durante 240 horas.</i>	<i>522</i>
<i>Figura 8.2 Consumo de glucosa medido como azúcares reductores en cultivos sumergidos de Trametes hirsuta Bm-2 inducidos con diferentes residuos lignocelulósicos a 35 °C durante 240 horas.</i>	<i>555</i>
<i>Figura 8.3 Cinética de transcriptos del gen lacasa en Trametes hirsuta Bm-2 crecido en medio mínimo y medios inducidos. Las barras de error representan el error estándar.</i>	<i>59</i>
<i>Figura 8.4 Mapa de calor de los transcriptos del gen lacasa en Trametes hirsuta Bm-2 crecido en medio mínimo y medios inducidos.</i>	<i>61</i>
<i>Figura 8.5 A) Expresión relativa del gen lcc de Trametes hirsuta Bm-2 comparada con la expresión del cultivo sin inducción de acuerdo al método $\Delta\Delta CT$. Las barras representan el error estándar. B) Mapa de calor de expresión relativa.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 8.6 Figura 8.5 Correlación de producción de lacasa y expresión del gen lcc en residuos de toronja (A) y salvado de trigo (B).</i>	<i>68</i>

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 2.1 Principales compuestos fenólicos estudiados en diferentes especies de hongos</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 8.1 Niveles máximos de producción de lacasas en los cultivos</i>	<i>533</i>

RESUMEN

La lignina presente en la lignocelulosa es un polímero heterogéneo muy difícil de degradar y solo los hongos de la podredumbre blanca son eficientes para degradar la lignina, donde las lacasas tienen un papel predominante. Las lacasas son enzimas que tienen amplia especificidad de sustratos y un gran potencial de aplicación en biorremediación, biopulpeo y síntesis orgánica, entre otros. Las principales dificultades del uso de lacasas son el alto costo de producción y el bajo nivel de enzimas. La adición de residuos lignocelulósicos al medio de cultivo puede inducir la producción de lacasas y favorecer su aplicación. Asimismo, el conocimiento de la regulación transcripcional de este gen en estos sustratos es importante para obtener información de las lacasas de este hongo y que podría ser usada para establecer estrategias de sobreproducción de estas enzimas. En este estudio se examinaron los niveles de producción de lacasas durante 240 horas de cultivo de *Trametes hirsuta* Bm-2 en medios suplementados con cáscara de toronja, naranja, mandarina, plátano y salvado de trigo que se usaron como inductores y en medio salino que se utilizó como control no inducido. El RNA fue extraído del micelio obtenido a diferentes tiempos de cultivo para analizar la expresión del gen lacasa usando la transcripción reversa cuantitativa (RT-qPCR). Se tomó como gen de referencia la β -actina para la normalización y determinación de la eficiencia de la reacción, lo que permitió la estimación adecuada de la expresión génica relativa. La actividad de lacasas en los extractos libres de células fue medida empleando ABTS como sustrato. Los resultados mostraron que en todos los medios suplementados con los residuos se incrementó la actividad de lacasas con respecto al medio salino, sin embargo, los perfiles de producción de lacasas variaron en función del sustrato. La máxima actividad obtenida fue de 5655 y 3515 U/mL a las 96h con toronja y naranja respectivamente, que representa un incremento de 81 y 58 veces con respecto al control. El nivel de los transcritos de lacasas mostró variaciones en los diferentes tiempos de cultivo. Los mayores niveles de expresión fueron alcanzados en el tratamiento con salvado de trigo. Los valores máximos de expresión relativa se obtuvieron a las 240 y 96 h (12.8 y 10.49 ER), mientras que para el tratamiento de

toronja el máximo nivel de expresión fue detectado a las 144 h con un valor de 6.71 ER. Es importante señalar que no hubo correlación directa en las cinéticas de actividad de lacasas y la expresión relativa del gen. Se requiere realizar más estudios para esclarecer estas diferencias, sin embargo los resultados sugieren que: a) durante el curso del cultivo se producen diferentes isoenzimas que difieren en su afinidad por el sustrato ABTS, lo que se refleja en incremento o decremento de actividad de lacasas. Otra posibilidad es que la composición de fenoles en los extractos enzimáticos, varía durante el cultivo y éstos difieren en su acción como mediadores redox favoreciendo o no la oxidación del ABTS por las lacasas.

Los hallazgos revelan un claro efecto de la cáscara de toronja y salvado de trigo en la inducción transcripcional de lacasas en *Trametes hirsuta* Bm-2. Asimismo, este estudio representa un modelo de la inducción de lacasas que contribuye a la escasa información reportada en desechos agroindustriales y que pueden contribuir al desarrollo de procesos para la producción comercial de lacasas.